DOI:10.11931/guihaia.gxzw201907062

传统傣药竹叶兰的花粉团发育及分类学意义

谭庆琴[1,2]，李璐[1*]，张锦[1,2]，王云强[3]，罗艳[4]，李青青[2]

（1. 西南林业大学 云南生物多样性研究院，昆明 650224；2. 西南林业大学 生命科学学院，昆明 650224；3. 中国医学科学院药用植物研究所云南分所，云南 景洪 666100；4. 中国科学院西双版纳热带植物园园林园艺部，云南 勐腊 666303）

摘要：利用石蜡切片技术观察了兰科单型属竹叶兰属的花粉团发育过程，包括花形态解剖特征、8 个花粉团的形成机制、花药壁发育模式、小孢子发生及雄配子体发育等特征，为该属复杂的系统亲缘关系提供胚胎学证据，结果如下。成熟花药有两个药室，每个药室有 4 个一簇金色的花粉团，被白色花药帽。早期花药原基分化出的一对并列侧生药室，每个药室中央小孢子囊分化出一对纵横交错的不育隔膜组织将其分割为 4 个次生小孢子囊，最后发育为 4 个花粉团。花药成熟时，由于每个药室内的花粉团间的隔膜组织发生不彻底降解，导致 4 个花粉团在花药开裂处粘合成一簇。发育完好的花药壁共有 6～7 层，由外到内为表皮、3～4 层药室内壁、中层和双核绒毡层，符合多层型花药壁的发育模式。花药成熟时，表皮退化，纤维性加厚发生在 3～4 层药室内壁，中层和绒毡层彻底降解。小孢子母细胞通过同时型胞质分裂产生了正四面体型、左右对称、十字交叉型排列的小孢子四分体。小孢子四分体继续保持在同一胼胝质内完成了雄配子体发育，形成了 2 - 细胞型的四合花粉。四合花粉两两或松散或紧密排列，构成了粉质花粉团。在前人的研究基础上，本文证实、补充并分析了竹叶兰属的花粉团发育特征，为该属的亲缘关系提供了胚胎学证据。

关键词：竹叶兰，花粉团发育，小孢子发生，多层型花药壁，分类学

中图分类号：Q949 **文献标识码：**A

Pollinia development in *Arundina graminifolia* (Orchidaceae) with taxonomic implications

TAN Qingqin[1,2], LI Lu[1*], ZHANG Jing[1,2],WANG Yunqiang[3], Luo Yan[4], LI Qingqing[2]

基金项目：国家自然科学基金(31260045,31460040)；国家中医药管理局全国中药资源普查项目（GZY-KJS-2018-004）[Supported by the National Natural Science Foundation of China (31260045, 31460040); the Fourth National Survey on Chinese Material Medical Resources (GZY-KJS-2018-004)]。

作者简介：谭庆琴（1996-），女，广西浦北人，硕士研究生，研究方向为植物系统与进化，(E-mail) T18877572260@163.com。

通信作者：李璐，博士，副研究员，研究方向为植物系统与进化、植物形态解剖学，(E-mail) lilusaraca@foxmail.com。

(1. *Yunnan Academy of Biodiversity, Southwest Forestry University*, Kunming 650224, China; 2. *School of Life Science*, *Southwest Forestry University*, Kunming 650224, China; 3. *Botanical Garden of Xishuangbanna South Medicine*, *Chinese Academy of Medical Science*, Jinghong 666100, Yunnan, China; 4. *Department of Horticulture and Gardening*, *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden*, *Chinese Academy of Sciences*, Mengla 666303, Yunnan, China)

Abstract: Pollinia development in *Arundina graminifolia* was investigated using paraffin section in order to clarify the relationships on a monotypic genus of *Arunidnia*. A ripened anther was composed of two thecae containing 2 clusters of 4 - pollinia with a white anther cap. The anther primordium was differentiated into a pair of lateral thecae bending toward the labium. Due to a combination of a cross and a longitudinal sterile septum differentiated in the center of each micrsoporangia, 4 sub-microsporangia produced and finally developed into 4 pollinia adherent together at the base by the incomplete degradation of septa. A complete anther wall was composed of 6 -7 layers, including an epidermis, 3 - 4 fibrous thickened endothecia, a middle layer, and a bi-nucleated tapetum, which conformed to the massive type. The microspore mother cells produced microspore tetrads through simultaneous cytokinesis, which were arranged in tetrahedral, isobilateral, and decussate types. The microspore tetrads developed into 2 - celled pollen tetrads which grouped into granular pollinia. Some embryological features during pollinia development in *A. graminifolia* were reconfirmed, supplemented, and emphasized based on the data reported, which could provide better understanding of its generic relationships.

Key words: *Arundina graminifolia*, pollinia development, microsporogenesis, massive type of anther wall, taxonomy

竹叶兰属(*Arundina* Blume)是兰科(Orchidaceae)树兰亚科(Subfam. Epidendroideae)中一类少有的“杂草类”兰花，广泛分布在亚洲的热带和亚热带地区（Seidenfaden & Wood, 1992; Lamb, 2010），生长在海拔 400~2800m 的草坡、溪谷旁、灌丛下或林中。在我国，该属见于南方热带和亚热带地区（陈心启，1999；Chen & Stephan, 2009）。在物种分类上，竹叶兰属曾被处理为 1 种，或 2 种，或 2 亚种（Chen & Stephan, 2009; Averyanov, 2007; Yorifuji et al., 2015）。早期研究认为这是由于它分布广、生境多样、叶型和花色变异较大引起的（Holttum, 1953; Henderson, 1954），后来的叶形态解剖和分子证据也证实了这一点（Lamb, 1994; Yorifuji et al., 2015）。对于竹叶兰表现出来的形态变异，我国植物学家先谨慎地认为该属有 1~2 种（陈

心启，1999），后来明确地倾向于我国只有 1 个种的观点（Chen & Stephan, 2009）。本文采纳了单型属的概念，认为竹叶兰是一个适应不同生境变异较大的广义种。

然而，竹叶兰属在亚族水平上的系统位置和亲缘关系尚不清楚，曾被归并到笋兰亚族（Thuniinae），或贝母兰亚族（Coelogyninae），或竹叶兰亚族（Arundininae）。例如，传统形态分类学把它放于笋兰亚族（Dressler et al., 1960），后又置于竹叶兰亚族（（Dressler, 1993; 陈心启，1999），并认为它与笋兰属（*Thunia*）、白及属（*Bletilla*）和国外分布的几个小属（*Bromheadia*, *Claderai*, *Dilochia*, *Trichoma*）亲缘关系较近（Dressler, 1960; Holttum, 1964)。另一方面，分子系统学把它放在贝母兰亚族（Freudenstein & Chase, 2015; Chase et al., 2015），或 Arethusinae 亚族（Li et al., 2016），认为它的近缘类群为：贝母兰属（*Coelogyne*）、独蒜兰属（*Pleione*）、足柱兰属（*Dendrochilum*）和国外分布的两个小属（*Dilochia* & *Glomera*）。事实上，尽管分子系统学明确地把兰科分为五个亚科，但关于亚科内的族、亚族的界定及其亲缘关系依旧混乱，亟待更多的证据来澄清，竹叶兰属也不例外（Cameron et al., 1999; Chase et al., 2003, 2015; Freudestein & Chase, 2015; Li et al., 2016）。考虑到与竹叶兰属相关的几个亚族的界限划分存在争议，确定或澄清它的近缘类群的系统关系就显得尤为重要。

兰科花药发育特征表现出丰富的多样性和特殊性，包括花粉团数目的形成机制、花药壁发育模式、小孢子发生和雄配子体形成等胚胎学特征在亚科、亚族和属间差异较大，具有重要的分类学意义（Swamy, 1949; Sood, 1989; Freudestein & Rasmussen, 1996; Johnson & Edwards, 2000; Freudestein & Chase, 2015; Chase et al., 2015; Givnish et al., 2015）。早期研究观察了竹叶兰（Rao, 1967）和一个近缘属 *Bromheadia*（Jeyanayaghy & Rao,1966）的花和种子的发育过程，揭示了它们的花药壁由 5 ~ 6 层细胞组成，腺质型绒毡层，以及小孢子四分体的排列方式等。其中，竹叶兰属的绒毡层为双核，而 *Bromheadia* 的为单核。在上述文献资料中，关于竹叶兰属及其近缘类群的花药发育过程中涉及到的一些重要的胚胎学特征都没有具体描述（Jeyanayaghy & Rao, 1966; Rao,1967; Swamy, 1949; Johri et al., 1992），如：花粉团的形成机制、花药壁发育类型、小孢子母细胞减数分裂的胞质分裂方式以及花粉发育过程中的败育现象等，

由于具有较高的观赏和药用价值，竹叶兰的研究主要集中在种子无菌萌发、原球茎诱导培养（如：陈之林等，2006; 张文珠等，2011；Cordova & Thammasiri, 2016）、细胞学（黄明忠等，2010）、繁殖生态学（Sugiura, 2014）和化学成分及药用活性分析等方面（如：Liu et., 2005; Hu et al., 2013; Gang et al., 2014；董伟等，2015）。值得一提的是，随着人为干扰活动的增加，竹叶兰在亚洲原产地被列为珍稀濒危物种（Sugirua, 2014），但在美洲中部和南部

以及太平洋诸岛，已成为颇具优势的归化种（Pridgeon et al., 2005; Okinawa, 2006），被视为具有潜伏性的外来入侵物种（Kolanowska & Konowalik, 2014）。因此，本文利用石蜡切片技术观察竹叶兰的花粉团发育过程，为更好地理解它的系统亲缘关系提供胚胎学证据，同时为在原产地加强就地保护，在原产地外形成入侵的生物学机制提供繁殖生物学证据。

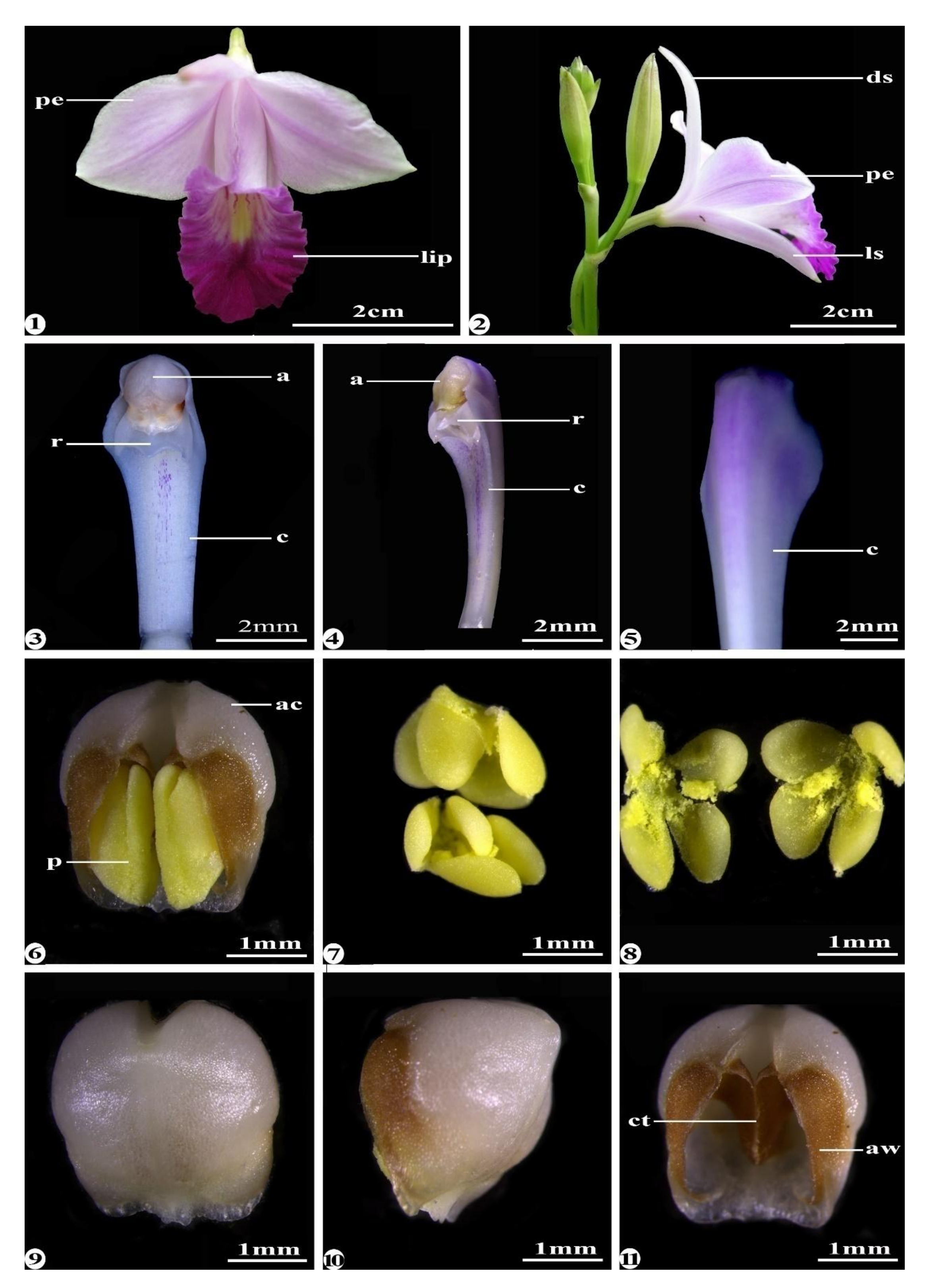
1 材料与方法

实验材料采集于中国科学院西双版纳热带植物园南药园，栽培多年，正常开花。2017年和 2018 年连续两年采集不同发育阶段的花蕾和开放花。取部分新鲜材料在 Leica 体式显微镜下观察拍照成熟花的形态解剖特征，其余新鲜材料固定于 50%的酒精，24 小时后转到70%的酒精常温保存。解剖镜下剥去多余的花萼和花瓣，仅留合蕊柱做石蜡切片观察。切片材料经酒精系列脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后，用 Leica RM2235 切片机切片，厚度为 5 ~ 7 μm，铁钒-苏木精染色，中性树脂封片，烘干后的切片在尼康 E600 光学显微镜观察并拍照，照片用图像编辑软件 Adobe Photoshop 7.0 排版分析。

2 观察结果

2.1 花形态解剖特征

总状花序顶生，具 2 ~10 朵花，每次仅开放一朵。花大，呈粉红色或略带紫色；萼片 3 枚，呈狭椭圆披针形；花瓣 2 枚，贴生于蕊柱基部，卵状椭圆形，与萼片近等长，明显宽于萼片；唇瓣近长卵圆状，基部内弯且围抱合蕊柱，前端具不规则褶皱（图版 I：1,2）。蕊柱长达 1.5 ~ 2 cm，淡紫色，顶部两侧有翼翅，延伸至花药背部，基部无明显的蕊柱足，蕊喙发达，白色（图版 I：3-5）。花药由两个药室组成（图版 I：6,9），每个成熟的花药室有 4 个金黄色的花粉团粘合成簇，花粉团为粉质（图版 I：7,8）。花药帽白色，呈头盔状，顶部由于花药开裂具一凹槽，背部光滑，药帽底部边缘具浅齿，内壁有明显的花药壁残迹（图版 I：9-11）。



1-2. 花的正面（1）和侧面（2）；**3-5.**合蕊柱的正面（3）、侧面（4）和背面（5），示合蕊柱顶端两侧的翼翅延伸和蕊喙；**6.** 带花粉团的花药帽；**7-8.** 4 个花粉团粘合成一簇，金黄色，粉质；**9-11.** 花药帽的正面（图 9）、侧面（图 10）、背面（图 11），示头盔状花药帽，内壁有残留的花药壁，背部光滑，顶部浅裂；**a.** 花药；**ac**. 花药帽；aw. 花药壁；**c.** 蕊柱；**ct.** 药隔组织；**ds.** 中萼片；**lip.**唇瓣；**ls.** 侧萼片；**p.** 花粉团；**pe.**

花瓣；**r**. 蕊喙。

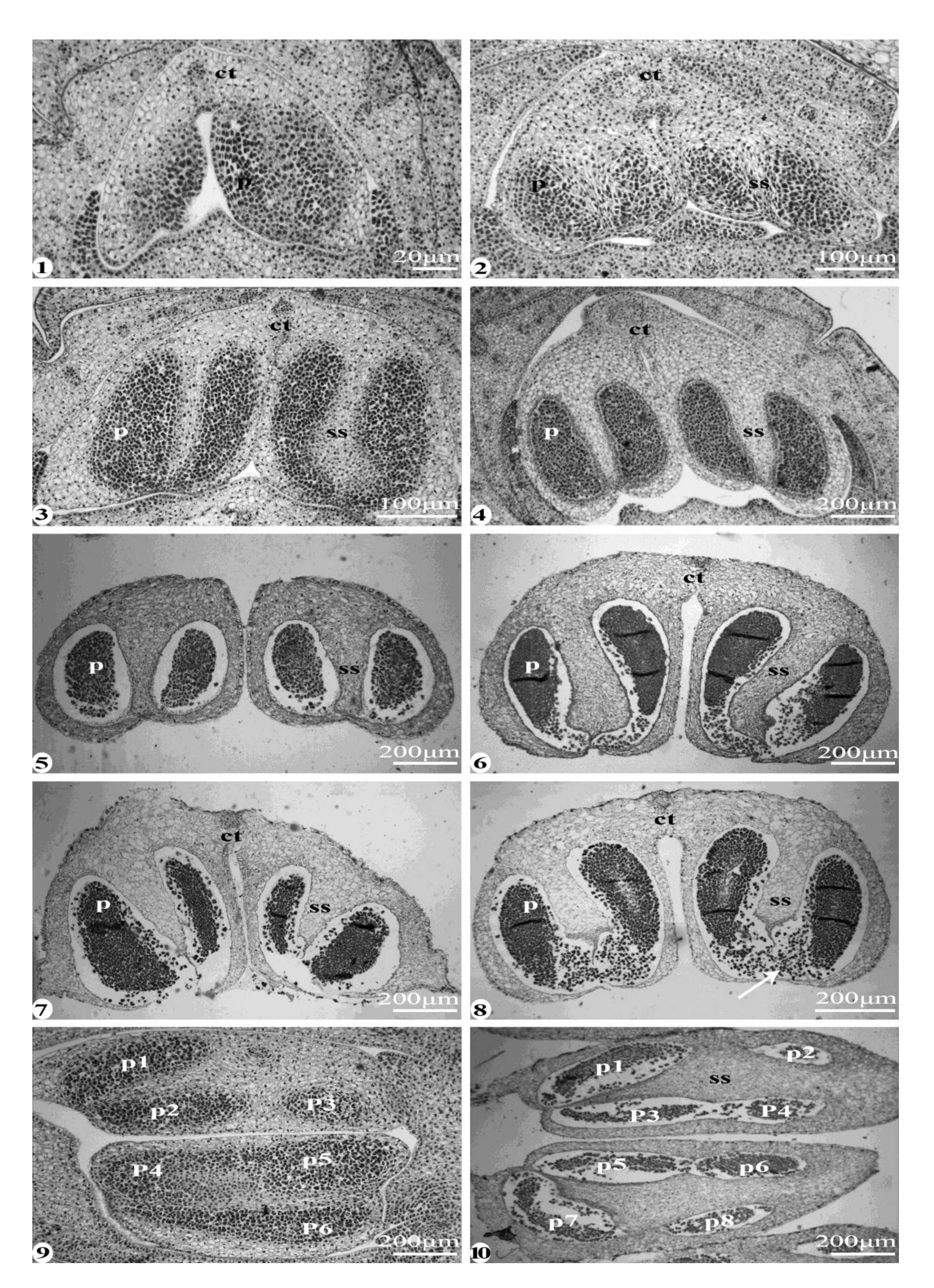
1-2. A flower in front (1) and side (2) views, noting the shape of lip; **3-5.** A column in front (3), side (4) and back (5) views, noting anther and rostellum; **6.** Pollinia in anther cap; **7-8.** 8 pollinia arranged in two clusters, noting granular pollinia; **9-11.** Anther cap in front (9), side (10), and back (11) views, noting the degenerated anther wall in the inner side, a cleft on the back top, and some teeth at the bottom. **a**. anther; **ac**. anther cap; **aw**. anther wall; **c**. column; **ct**. connective tissue; **ds**. dorsal sepal; **lip**. labium; **ls**. lateral sepal; **p**. pollinia; **pe**. petal; **r**. rostellum.

图版 I 竹叶兰的花解剖特征

Plate I Floral anatomy in *Arundina graminifolia*

2.2 八个花粉团的形成机制

早期的花药原基为一团细胞分裂活动旺盛的分生组织细胞，随着中央药隔组织细胞的分化形成了一对逐渐向唇瓣弯曲的并列药室，包裹着分化好的孢原细胞组织。接着，药室内不同区域的孢原细胞有了三条分化途径：位于药室中央的孢原细胞带分化不育隔膜组织；药室表皮下的一层孢原细胞充当初生周缘壁细胞；其余部位的孢原细胞直接发育为小孢子母细胞（图版 II：1,2）。在小孢子母细胞减数分裂期间，每个药室沿中央的极轴（图版 II：2-8）和赤道轴（图版 II：9,10）分化出两条纵横交错的不育隔膜组织，以十字交叉的方式把小孢子囊分化为 4 个次生小孢子囊，到花药成熟时发育为 4 个花粉团。在花粉团发育过程中，从小孢子母细胞进入减数分裂之前，每个药室的 4 个次生小孢子囊都与花药壁紧密相连（图版 II：1-4）；到小孢子四分体阶段，随着花药壁中层和绒毡层细胞的降解，次生小孢子囊和花药壁之间出现了明显空隙（图版 II：5,6）。与此同时，每个药室的隔膜组织也发生不同程度降解，在花粉团成熟时，靠花药开裂处的隔膜组织比近药隔组织的降解速度快且彻底，（图版 II：6-8），因此每个药室内的 4 个花粉团出现了部分融合黏连（图版 II：8），构成了 4 个一簇的花粉团（图版 I：7,8）。



1-2. 早期花药原基分化为由药隔组织相连的一对并列侧生药室，超唇瓣方向弯曲生长，每个药室中央分化出一条纵向的隔膜组织将孢原细胞组织分为两部分（2）；**3 -4.** 在小孢子母细胞减数分裂期间，每个药室的纵向隔膜组织不断扩大，把小孢子囊分化为明显的 2 个次生小孢子囊；**5-6.** 小孢子四分体时期的花药室，次生小孢子囊和花药壁之间出现了明显的空隙，部分小孢子四分体排列松散；**7- 8.** 2 - 细胞型花粉时期的

花药室纵切面，示药室顶部开裂，准备散粉，注意药室开裂处的花粉团间出现了融合黏连（8：箭头所示）；**9-10.** 小孢子母细胞减数分裂期（9）和 2 - 细胞型花粉时期（10）花药的横切面，示花药发育过程中，每个药室中央沿极轴和赤道轴分化出两条纵横交错的不育隔膜组织，将每个药室的孢子囊分化为 4 个次生孢子囊，最终发育为 4 个成熟花粉团。**ct**. 药隔组织；**lip**. 唇瓣；**p**. 花粉团；**sp**. 开裂处；**ss**. 不育隔膜组织。

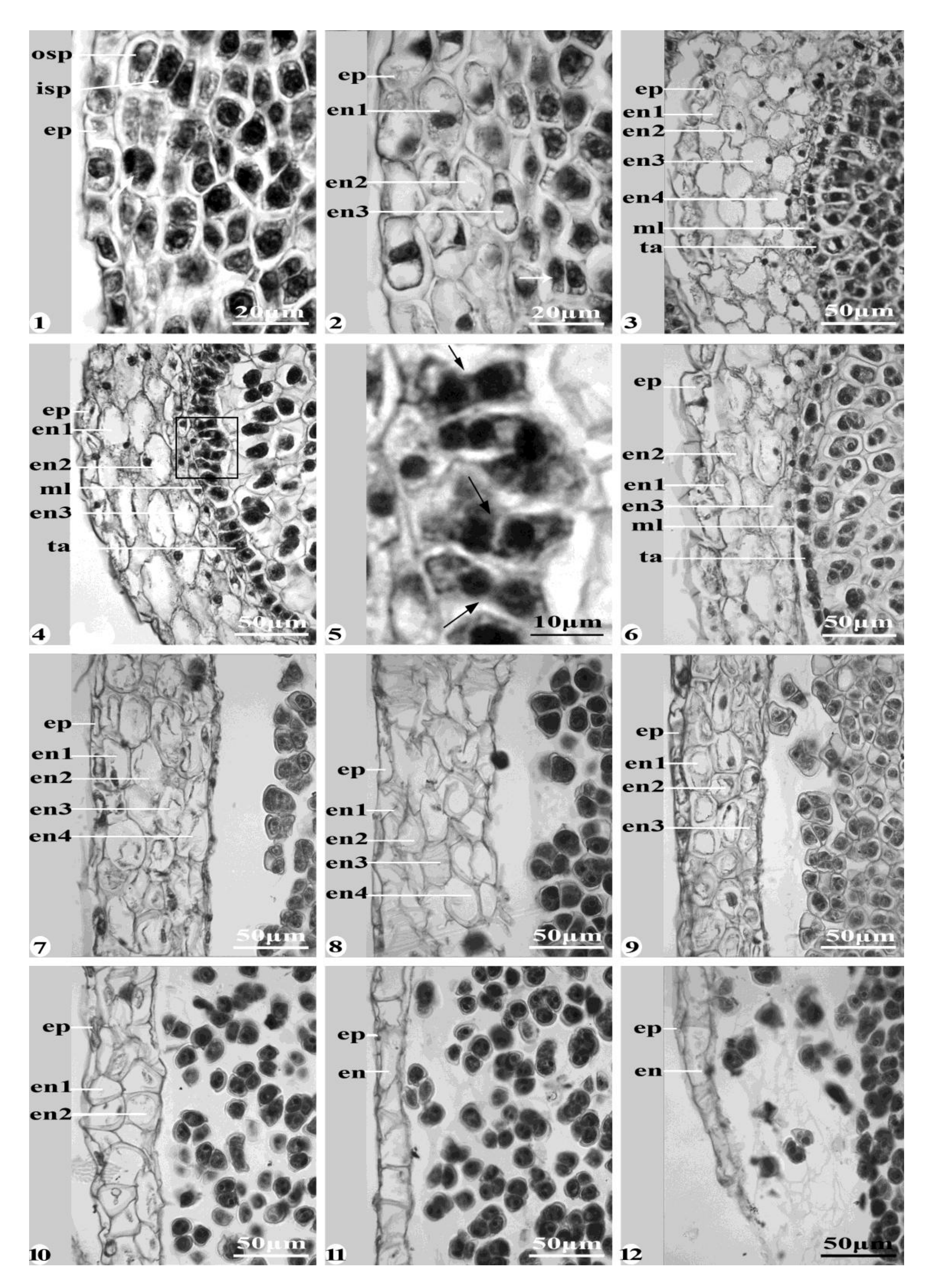
1-2. Anther primordium was initiated into a 2-lateral thecae bending toward the labium with a connective tissue; **3-4.** During the meiosis of microspore mother cells, a longitudinal sterile septum divided each theca into two sub-sporangia surrounded tightly by anther wall; **5-6.** At the stage of microspore tetrads, two sub-sporangia became loosened and separated from anther wall; **7-8.** The mature anther split due to the anther wall broken, noting two pollinia becoming partially united at the top part（arrow in Fig.8); **9-10.** Transverse sections of an anther at the stages of microspore mother cells (9) and at 2-celled pollen tetrads, indicating a longitudinal and a cross sterile septa separated each sporangium into 4 sub-sporangia in each theca. ct. connective tissue; **lip**. labium; **p**. pollinia; **sp**. split; **ss**. sterile septum.

图版II 竹叶兰 8 个花粉团的形成机制

PlateII The formation pattern of 8 pollinia in *Arundina graminifolia*

2.3 花药壁的发育模式

早期花药原基由最外一层排列整齐的表皮细胞和靠内的一团染色较深的孢原细胞构成。接着，表皮下的一层孢原细胞充当了初生周缘壁细胞的功能，通过平周分裂为靠外的外次生周缘壁细胞和靠内的内次生周缘壁细胞（图版 III：1）。前者直接发育为第一层药室内壁，后者继续进行几次平周分裂，依次产生了 2 ~ 3 层药室内壁、中层和绒毡层（图版 III：2,3），在小孢子母细胞阶段完成了花药壁发育（图版 III：4）。发育完好的花药壁共有 6 ~ 7 层（图版 III：4,6），由外至内，分别为：表皮、3 ~ 4 层药室内壁、中层和绒毡层，符合多层型（the massive type）花药壁发育模式（Sood, 1989）。小孢子母细胞减数分裂期间，中层和绒毡层开始退化，导致孢子囊和花药壁之间出现明显的空隙（图版 III：6-9）。绒毡层细胞小，呈圆形，双核（图版 III：4,5），属于腺质型绒毡层。同时，表皮细胞也开始发生降解，呈不规则齿状排列（图版 III：6），到 2 - 细胞花粉时期，逐步退化为残迹（图版 III：7-12）。在雄配子体形成阶段，3 ~ 4 层药室内壁细胞轮廓增大，阔卵形，开始出现不均匀的纤维性加厚，到 2 - 细胞花粉时（图版 III：7-12），花药壁仅剩下 1 ~ 2 层药室内壁，在药室顶部出现裂口（图版 III：12），准备散粉。



1. 早期的花药原基，表皮下的一层孢原细胞充当了初生周缘细胞的功能，平周分裂形成两个内外的次生周缘细胞（箭头所示）；**2.** 外次生周缘壁细胞直接发育为第一层药室内壁，内次生周缘比细胞经过 1～2 次平周分裂形成了 3 层药室内壁和继续分裂形成中层和绒毡层的子细胞（箭头所示）； **3-4.** 发育完全的花药壁，注：药室内壁有 3～4 层；**5.** 图 4 方框部分放大：示绒毡层细胞为双核 (箭头)；**6-9.** 小孢子母细胞减数分

裂阶段，中层和绒毡层逐渐被吸收降解，药室内壁方式不均匀的纤维性加厚，表皮细胞逐渐变退化；**10-11.** 小孢子发生阶段，药室内壁逐层降解；**12.** 2 - 细胞花粉时期，花药壁仅剩药室内壁，出现断裂，准备散粉。

en. 药室内壁；**ep**. 表皮；**isp**. 内次生周缘壁细胞；**ml**. 中层；**osp**. 外次生周缘壁细胞；**ta**. 绒毡层。

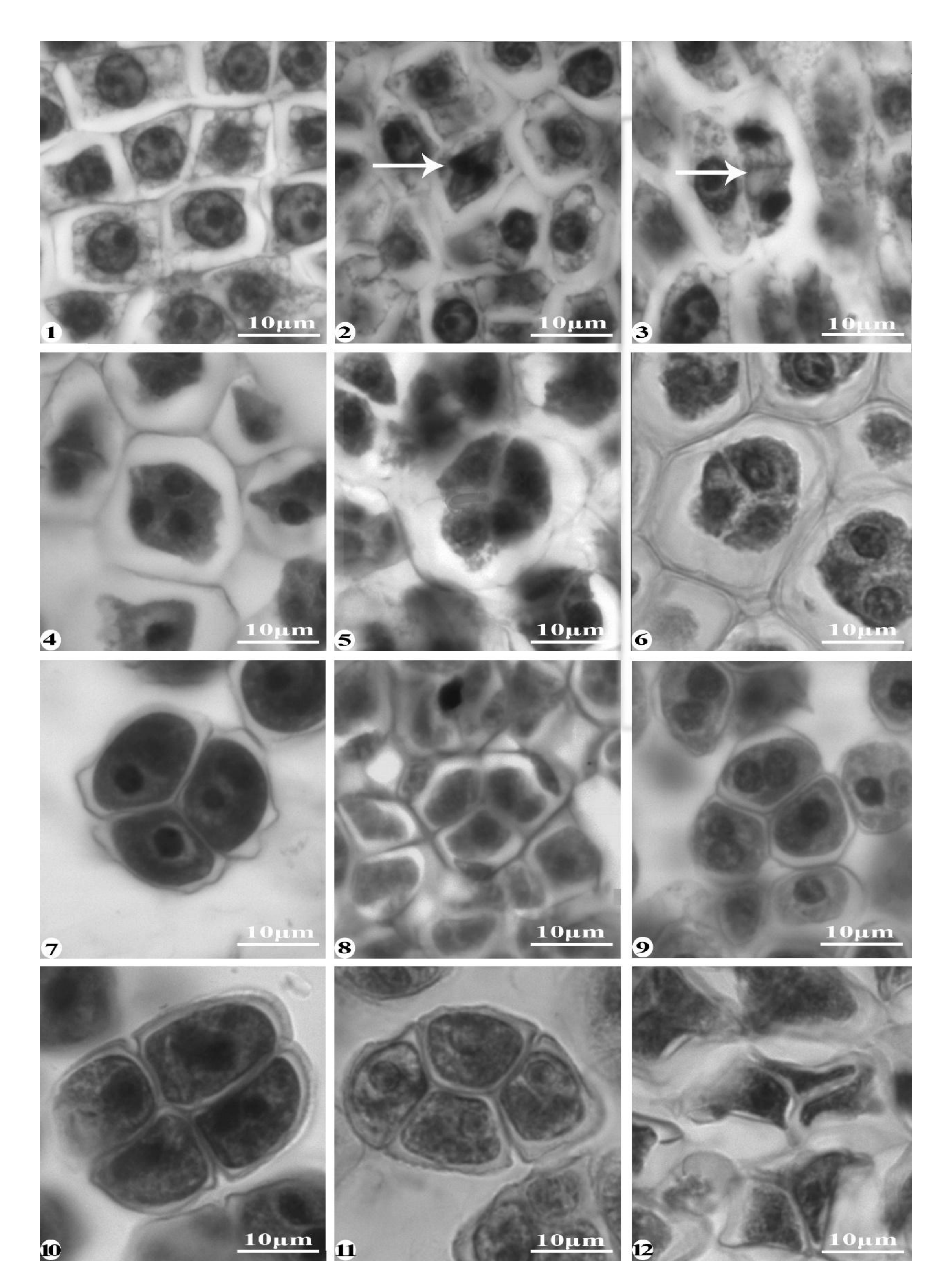
1. A hypodermal archesporial cell functioned as primary parietal cell,dividing into the outer and inner secondary parietal cells; **2.** The outer one directly functioned as the first layer of endothecium, while the inner one produced other 2-3 endothecia and a middle layer and a tapetum (arrow); **3-4.** A complete anther wall consisted of epidermis, 3-4 endothecial, a middle layer, and a tapetum; **5.** The enlargement of a box part in fig.4, noting the 2-nucleated tapetum (arrows); **6-9.** During the meiosis of microspore mother cells, epidermis, the middle layers, and tapetum became degenerated while 3 endothecial became fibrous thickened; **10-11.** The epidermal cells become flat and elongated, while endothecia became degraded gradually; **12.** At 2-celled pollen stage, the anther wall continued degraded and split. **en**. endothecium; **ep**. epidermis; **isp**. the inner secondary parietal cell; **ml**. the middle layer; **osp**. the outer secondary parietal cell; **ta**. tapetum.

图版III 竹叶兰的花药壁发育

Plate III Anther wall development in *Arundina graminifolia*

2.4 小孢子发生和雄配子体发育

小孢子母细胞呈不规则多边形，细胞轮廓增大，核质比大，排列紧密（图版Ⅳ：1）。小孢子母细胞经过减数分裂 I 形成了两个子核（图版Ⅳ：2,3），没有形成子细胞壁，保持在同一个细胞壁内，完成了减数分裂 II，产生了子细胞壁不明显的小孢子四分体前体（图版Ⅳ：4）。接着四个小孢子同时形成了明显的子细胞壁，发育为被胼胝质包被的小孢子四分体（图版Ⅳ：5,6）。因此，小孢子母细胞减数分裂的胞质分裂方式为同时型（Davis，1966）。在雄配子体发育过程中，小孢子并没有从胼胝质中单粒释放出来，而是继续以四分体的形式完成有丝分裂，形成了小的生殖细胞和大的营养细胞，发育为 2-细胞型的四合花粉（图版 IV：8，9）。四合花粉两两结合，有的排列紧密，有的稀疏分开，构成了松散型的粉质花粉团（图版 I：7,8）。在雄配子体发育过程中，小孢子囊外缘的部分小孢子四分体未能继续进行有丝分裂，出现了花粉败育现象（图版 IV：12）。小孢子四分体排列形式多样，主要为正四面体（图版Ⅳ：6-9）和十字交叉排列（图版Ⅳ：11），稀左右对称型（图版Ⅳ：10）。



1. 小孢子母细胞多边形，排列紧密；**2-6.** 小孢子发生：减数分裂 I 中期（2），减数分裂 I 后期（3），减数分裂 II 末期（4），小孢子四分体（5，6）；**7-11.** 雄配子体发育：小孢子有丝分裂形成 2 核（7），生殖细胞靠边，呈月牙形（8），生殖核并入营养核（9），2 - 细胞型花粉（10, 11），小孢子四分体排列形式多样：正四面体（6-9），左右对称（10），十字交叉（11）；**12.** 败育花粉。

1. Microspore mother cells; **2 - 6.** Microsporogenesis: metaphase I (2), anaphase I (3), telophase II (4) in meiosis, microspore tetrads (5, 6); **7 - 11.** Male gametogenesis, microspore divided into 2 nuclear daughter cells, a generative cell lying side while vegetative cell at the center of the cell (7, 8), a generative cell moved into vegetative cell (9), 2-celled pollen tetrads (10, 11), noting the microspore and pollen tetrads in tetrahedral (6-9), isobilateral (10), decussate (11) arrangements; **12.** Aborted pollens.

图版IV 竹叶兰的小孢子发生和雄配子体发育

Plate IV Microsporogenesis and male gametogenesis in *Arundina graminifolia*

3 讨论

3.1 竹叶兰花药发育过程中的胚胎学特征的证实、澄清和补充

通过和前人研究过的竹叶兰的花药发育特征（Rao, 1967）的比较分析，本文证实、澄清和补充了该属花药发育过程中的一些具有分类学意义的胚胎学特征。首先，本文观察到的一些花药发育特征和前人的一致，证实了竹叶兰的花药发育有以下稳定特征：花药 2 室，6 ~ 7 层花药壁，双核型绒毡层属分泌型；小孢子四分体排列形式多样，有正四面体、左右对称和十字交叉型；2 - 细胞型的四合花粉。其次，本文澄清了竹叶兰的花药壁的组成。本文观察到花药壁层数为 6 ~ 7 层，包括 3 ~ 4 层药室内壁和 1 层中层。然而，前人的研究结果认为，花药壁有 5 ~ 6 层，包括 1 层药室内壁和 2 ~ 3 层中层。显然，这样的争议在于药室内壁和中层细胞的判断。根据药室内壁细胞大而呈阔卵形且在后期会发生纤维性加厚；中层细胞轮廓细长的特征（Davis, 1966; Johri et al., 1992; 胡适宜，1982，2005），本文把观察到的表皮下形态高度相似呈阔卵形的 2 ~ 3 层细胞判断为药室内壁。同时，本文系统地揭示了竹叶兰 8 个花粉团的形成机制、多层型花药壁发育模式、同时型胞质分裂方式等胚胎学特征，并结合其他兰科植物的发育特征比较分析了它们的分类学意义，具体如下。

3.2 竹叶兰 8 个花粉团形成机制的分类学意义

本研究结果证实了树兰亚科 8 个花粉团的形成机制是由于早期花药原基分化出的每个药室中央出现了两条纵横交错的不育隔膜组织形成的（Freudestein & Rasmussen, 1996）。现有研究表明，兰科 90%以上的物种都具有不同数目和形态的花粉团，集中在树兰亚科和兰亚科（Cameron et al., 1999; Chase et al., 2003, 2015）。形态发育解剖学研究表明，兰科不同数目的花粉团（2, 4, 6, 8）的形成机制是因为早期花药原基分化出来的一对侧生药室中央，分化出不同数目和朝向的不育隔膜组织在花药成熟时发生降解成空隙而导致的（Freudestein & Rasmussen, 1996）。这得到了后续研究资料的证实和补充。例如：具有 2 对深裂花粉团的兰

属（*Cymbidium*）是由于每个药室中央的隔膜组织没有彻底贯穿小孢子囊而形成的（(Bhanwra et al., 2006; Kant & Goel, 2013)；具有 4 个花粉团的沼兰属（*Malaxis*）是因为不育隔膜组织的彻底贯穿和降解发育来的（Kant & Hossain, 2010; Gurudeva, 2015）；具有 2 个不同程度浅裂、深裂或全缘的花粉团的指甲兰亚族则是源于不育隔膜组织沿不同朝向和不同程度切割小孢子囊造成的（张锦等，2019；李璐等，2019）。然而，关于树兰亚科中 8 个花粉团的发育机制的补充资料却不多见。树兰亚科具有 8 个花粉团的类群，其形成机制推测应该有两种方式（Freudestein & Rasmussen, 1996）。一种是早期花药发育时，每个药室分别沿极面观和赤道面分化出两条纵横交错的不育隔膜组织，最终发育为 4 个短棒状花粉团，例如虾脊兰（*Calanthe rubens*）、香花毛兰（*Eria javanica*）和矮柱兰（*Thelasis pygmaea*）。另一种可能是早期花药发育过程中，每个药室的孢原细胞组织沿极面观分化出两条十字交叉的纵向不育隔膜组织，最终发育为 4 对长棍棒状花粉团，但尚未有解剖资料资料证实。显然，本文研究结果证实了了竹叶兰 8 个花粉团的形成机制符合前者。

同时，本文还揭示了竹叶兰 4 个花粉团成簇的形成机制是因为花药发育成熟时，靠近药室开裂处的隔膜组织降解较快而且彻底，才形成了基部粘合在一起的簇状花粉团。这一点尚未有其他研究资料报道（Freudestein & Rasmussen, 1996）。事实上，在树兰亚科的 8 个花粉团的类群中，尤其是和竹叶兰属相关的白芨亚族(Subtrib. Bletillinae)、拟白及亚族(Subtrib. Bletlinae)和筒瓣兰亚族(Subtrib. Anthogoniinae)等，均存在着花粉团柄的有无、或粘性物质的有无等形成的 2 簇或 4 簇花粉团的不确定描述（陈心启等，1999）。例如，具有 8 个花粉团的蕾丽兰属(*Laelia*)，因有花粉团柄的存在，可描述为 8 个独立的花粉团或 2 对 4 深裂的花粉团，这需要对花粉团内部组织结构进行解剖方可准确判断（Freudestein & Rasmussen, 1996）。显然，竹叶兰属的 4 个花粉团粘结成簇，没有通过其他组织如花粉团柄或其他来源的粘性物质，而是花粉团基部的次生融合构成的。从某种意义上来说，4 个花粉团粘结成簇，并非是因为小孢子囊组织的 4 深裂而造成的，而是通过不育隔膜组织的纵横交错分割成 4 个次生小孢子囊，后在发育成熟时，由于隔膜组织的部分降解，再次融合成 4 个一簇。因此，通过形态解发育学比较研究兰科不同数目和形态的花粉团的形成机制，对于亚科内不同族、亚族和属的界定和亲缘关系的澄清有着极大的分类学意义（Freudestein & Rasmussen, 1996）。

3.3 竹叶兰多层型花药壁发育模式及分类学意义

被子植物中，花药壁的层数和来源在属级以上的分类系统中是稳定的，具有重要的分类学意义（Davis, 1966; Johri et al., 1992）。根据花药壁的层数和中层细胞的来源，可以分为具有 5 层且包含 2 层中层的基本型，具有 4 层但中层来源不同的单子叶型和双子叶型，以及中

层缺失仅有 3 层花药壁的简化型（Davis, 1966; Johri et al., 1992；胡适宜，1982, 2005）。在上述四种基本类型中，双子叶型最常见，在所有研究过的胚胎学的被子植物中约占 80%，出现在大部分双子叶植物中。单子叶型较少见，出现在大部分单子叶植物中，偶见部分双子叶植物，如肋果茶属（Li et al., 2003）。此外，基本型和简化型最少见，只出现于部分植物家族。

竹叶兰的花药壁有 6 ~ 7 层，属于多层型，进一步证实和补充了兰科的花药壁发育类型有 2 种：单子叶型和多层型。长期以来，兰科花药壁发育模式均被描述为具有 4 层细胞的单子叶型，被认为是该科稳定的分类学特征（Davis, 1966; Johri et al., 1992；胡适宜, 1982, 2005）。它在兰亚科的斑叶兰属（*Goodyera*）（Sood, 1988; Kant & Goel, 2013），玉凤花属（*Habenaria*）（Sood, 1986）和树兰亚科的 *Microstylis*（Sood, 1985, 1986），沼兰属（*Malaxis*）（Sood, 1992; Kant & Hossain, 2010; Gurudeva, 2015）和巾唇兰属（*Pennilabium yunnanense*）（李璐等，2019）等类群中比较普遍。然而，除了单子叶型外，部分兰科的花药壁可达 5~7 层以上，被称为多层型（Sood, 1989），目前仅出现在兰科。事实上，多层型花药壁的早期描述出现在树兰亚科的石斛属(*Dendrobium*)和万代兰属(*Vanda*)（Swamy, 1949）、竹叶兰属(Rao, 1965)及其近缘属 *Bromeheadia* (Jeyanayaghy & Rao, 1966)，后来在杓兰亚科的杓兰(*Cypripedium cordigerum*) (Sood & Rao, 1988; Kant, 2011)等也有明确记载。随着它在羊耳蒜属(*Liparis*)的首次命名和描述（Sood, 1989），多层型花药壁在树兰亚科的兰属(*Cymbidium*) (Kant et al., 2013)、万代兰属(*Vanda*)（张锦等，2019）和苞舌兰属（*Spathoglottis*）（Sriyot et al., 2015）陆续报道。由上述研究资料可以看出，尽管单子叶型和多层型在杓兰亚科、树兰亚科和兰亚科中均有报道，但同一个属的花药壁发育类型是稳定的。随着新资料的不断积累，兰科花药壁发育类型的分类系统学意义将会得到更好的理解。

3.4 竹叶兰属的同时型胞质分裂和小孢子四分体排列的系统分类学意义

竹叶兰属的小孢子母细胞经过同时型胞质分裂产生了正四面体、左右对称和十字交叉型的小孢子四分体，与其他大部分研究过的兰科植物的特征相似（Swamy, 1949；Jorhri et al., 1992；Sriyot et al., 2015；张锦等，2019；李璐等，2019）。被子植物的胞质分裂方式和小孢子四分体排列形式的系统分类学意义一直受到关注，目前有以下 3 个观点。第一，早期研究认为，被子植物的胞质分裂方式有两种：同时型和连续型，分别为双子叶型和单子叶型的分类学特征（Jorhri et al., 1992）。然而，虽然兰科属于传统意义上的单子叶植物，但研究过的兰科普遍具有同时型胞质分裂（如：Swamy, 1949；Johri et al., 1992；梁汉兴，1981；徐正尧和杨貌仙，1986；Sood, 1985, 1986, 1988；Sood & Rao, 1986; Sriyot et al., 2015），只有少

数几个属为连续型，例如眉兰属(*Ophyrs*)（Aybeke, 2012）和万代兰属（张锦等，2019）。因此，兰科的胞质分裂方式在被子植物系统演化中具有重要的意义，值得进一步研究。第二，有研究表明，被子植物基部类群和单子叶植物的胞质分裂方式和小孢子四分体的排列形式有一定联系（Nadot et al., 2008）。例如，连续型胞质分裂产生的小孢子四分体只有四边形（或十字交叉型，T 型，线型），但同时型的小孢子四分体的排列形式更多样化，既有四边形，也有正四面体型和菱形（Nadot et al., 2008）。显然，本文研究结果过以及其他已有的兰科研究资料并不支持这一观点。第三，胞质分裂方式和花粉萌发孔类型是否存在必然联系，值得进一步探讨。对被子植物基部类群和单子叶植物来说，胞质分裂方式和花粉萌发孔类型之间并无直接的必然联系（Nadotet al., 2008），但对模式植物拟南芥的研究发现，连续型胞质分裂方式影响了花粉萌发孔的类型(Albert et al., 2011)。对于萌发孔缺失的大部分兰科植物（Johri et al., 1992）而言，胞质分裂方式和花粉形态之间的关系值得进一步研究。综上所述，竹叶兰花粉团发育过程中表现出的胚胎学特征在兰科花药发育多样性方面具有重要的分类学意义。

3.5 竹叶兰属与近缘属 *Bromheadia* 的花药发育的比较研究

如前所述，竹叶兰属可能的近缘类群有笋兰属、白芨属、贝母兰属和独蒜兰属等，但由于胚胎学资料的缺乏，目前能够用于花药发育比较研究的只有分布在马来西亚群岛的一个近缘属(*Bromheadia*)（Jeyanayaghy & Rao, 1966）。首先，两个属具有一些共同的花药发育特征，与大部分研究过的兰科植物基本一致（Johri et al., 1992），如：同时型胞质分裂、腺质型绒毡层、纤维性加厚发生于药室内壁、2-细胞型四合花粉等。由于这些相似性，尤其是多层型花药壁发育特征，为两个属成为近缘属提供了合理性。其次，竹叶兰属和 *Bromheadia* 在绒毡层细胞核的数目和小孢子四分体排列形式方面具有明显区别。竹叶兰属的绒毡层细胞为为兰科植物少见的 2 核型，小孢子四分体排列多为正四面体、左右对称和十字交叉型，但 *Bromheadia* 的绒毡层细胞为兰科常见的单核，小孢子四分体的排列为正四面体、左右对称和线型。因此，从目前仅有的胚胎学资料来看，竹叶兰属的胚胎学特征支持它和 *Bromheadia* 具有一定的亲缘关系。

致谢：本研究依托西南林业大学大型仪器共享平台和云南生物多样性研究院科研实验平台完成石蜡切片观察实验，实验过程中得到西南林业大学古旭老师的帮助。

参考文献：

ALBERT B, RAQUIN C, PRIGENTM, et al., 2011. Successive microsporogenesis affects pollen aperture pattern in the tam mutant of *Arabidopsis thaliana* [J]. Annals Bot, 107 (8): 1421 - 1426.

AYBEKE M, 2012. Anther wall and pollen development in *Ophrys mammosa* L. (Orchidaceae) [J]. Plant Syst Evol, 298(6): 1015 - 1023.

AVERYANOV LV, 2007. New species of orchids from Vietnam [J]. Taiwania, 52: 287 - 306.

BHANWRA RK, SP VIJ, CHANDEL V, et al., 2006. Development of pollinium in two epidendroid orchids [J]. Curr Sci, 90 (10): 1384 - 1388.

CAMERON KM, CHASE MW, WHITTEN WM, et al., 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: Evidence from rbcL nucleotide sequences [J]. Amer J Bot, 86 (2) : 208 - 224.

CHASE MW, CAMERON KM, BARRETT RL, et al., 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: A new phylogenetic classification. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ. eds. Orchid conservation [M]. Kota Kinabalu: Natural History Publications (Borneo), 69 - 89.

CHASE MW, CAMERON KM, FREUDENSTEIN JV, et al., 2015. An updated classification of Orchidaceae [J]. Bot Linn Soc, 177(2): 151 - 174.

CHEN SC, 1999. Trib. Epidendreae. In: Lang, K.Y. (Ed.) Flora Republicae Popularis Sinicae, Vol.18 [M]. Science Press, Beijing. [陈心启，1999. 树兰亚族。在：郎楷永（主编）中国植物志 18 卷 [M]，科学出版社，北京]

CHEN XQ, STEPHAN WG, 2009. *Arundina*. In: Wu ZY, Raven PH, Hong DY (Eds.) Flora of China Vol. 25 [M]. Sciences Press, Beijing, in association with Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, pp. 314 - 315.

CHEN ZL, ZENG SJ, WEN TL, 2006. Asepsis Sowing and in vitro Propagation of *Arundina graminifolia* Hochr [J]. Plant Physiol Comm, 42(1): 66 - 66. [陈之林，曾宋君，温铁龙 等，2006，竹叶兰的无菌播种和试管成苗 [J]. 植物生理学通讯, 42(1): 66 - 66.]

CORDOVA LB, THAMMASIRI K, 2016. Cryopresevation on a cryo-plate of *Arundina graminifolia* protocorms, dehydrated with silica gel and drying beads [J]. Cryoletters, 37 (2): 68 - 76.

DAVIS GL, 1966. Systematic embryology of the angiosperms [M]. New York: John Wiley & Sons.

DONG W, ZHOU K, WANG YD, et al., 2015. Anew phenylpropanoid from Dai Medicine *Arundina graminifolia* and its anti-tobacco mosaic virus activities [J]. Chin Trad Herb Drugs, 46 (20): 2996 - 2998. [董伟，周堃，王月德等，2015. 傣药竹叶兰中 1 个新苯丙素及其抗烟草花叶病毒活性[J]. 中草药, 46(20):2996 - 2998.]

DRESSLER RL, DODSON, CALAWAY H, et al., 1960. Classification and phylogeny in the Orchidaceae [J]. Ann Missouri Bot Gard, 47(1):25 - 68.

DRESSLER RL, 1993. Phylogeny and classification of the orchid family [M]. Cambridge: Cambridge University Press.

FREUDENSTEIN JV, RASMUSSEN FN, 1996. Pollinium development and number in the Orchidaceae [J]. Amer J Bot, 83(7): 813 - 824.

FREUDENSTEIN JV, CHASE MW, 2015. Phylogenetic relationships in epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: progressive specialization and diversification [J]. Ann Bot, 115(4):665 - 681.

GANG D, SHEN Y, YANG L, et al., 2014. Bibenzyl derivatives of *Arundina graminifolia* and their cytotoxicity [J]. Chem Nat Compd, 49(6): 1019 - 1022.

GIVNISH TJ, SPALINK D, AMES, et al., 2015. Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification [J]. Proc R Soc B, 282: 20151553.

GURUDEVA, MR, 2015. Ontogeny of Microsporangium and Development of Male Gametophyte in *Malaxis Versicolor* (Lindl .) Abeyw [J]. J Indian Bot Soc, 94, 195–201.

HENDERSON MR, 1954. Malayan wild flowers. Monocotyledons [M]. Kuala Lumpur.

HOLTTUM RE, 1953. Flora of Malaya--- Orchids of Malaya [M]. Singapore.

HOLTTUM RE, 1964. A revised flora of Malaya. Vol. 1, Orchids of Malaya. 3rd ed [M]. Singapore: Government Printing Office.

HU QF, ZHOU B, YE YQ, et al., 2013. Cytotoxic deoxybenzoins and diphenylethylenes from *Arundina graminifolia* [J]. J Nat Prod, 76(10):1854.

HU SY, 1982. Embryology of angiosperms [M]. Beijing: Higher Education Press. [胡适宜，1982. 被子植物胚胎学[M]. 北京：高等教育出版社.]

HU SY, 2005. Reproductive biology of angiosperms [M]. Beijing: Higher Education Press. [胡适宜，2005.被子植物生殖生物学 [M]. 北京：高等教育出版社.]

HUANG MZ, MO R, LENG QY, et al., 2010. The karyotype analysis of *Arundina graminiforia*

and *Eria gagnepainii*. [J] Chin Agric Sci Bull, 26(12): 339 - 343. [黄明忠,莫饶，冷青云等, 2010. 竹叶兰和香港毛兰的核型分析 [J]. 中国农学通报，26(12): 339 - 343.]

JEYANAYAGHY S, RAO AN, 1966. Flower and Seed Development in *Bromheadia finlaysoniana* [J]. Bull Torrey Bot Club, 93(2): 97-103.

JOHNSONS D, EDWARDS TJ, 2000. The Structure and function of orchid pollinaria [J]. Plant Syst Evol, 222: 243 - 269.

JOHRI BM, AMBEGAOKAR KB, SRIWASTAVA PS, 1992. Comparative embryology of angiosperms [M]. Springer Berlin Heidelberg.

KANT R, 2011. Development of monads and associated changes in anther in *Cypripedium cordigerum* D . Don. : A rare Orchid [J]. Vegetos, 24(1), 103 - 110.

KANT R, HOSSAIN MM, 2010. Development of pollinium in *Malaxis muscifera* (Lindl.) Kuntze [J]. Bangladesh J Bot, 39(2): 193 - 198.

KANT R, GOEL S, 2013. Development of Anther in *Goodyera repens* (L.) R. Br: A Massulate Orchid [J]. Vegetos, 26(1), 09-18.

KANT R, HOSSAIN MM, ATTRI LK, 2013. Pollinium development in *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames. and *Cymbidium pendulum* SW: a comparative study [J]. Bangladesh J Bot, 42 (2): 307 - 314.

KOLANOWSKA M, KONOWALIK K, 2014. Niche conservatism and future changes in the potential area coverage of *Arundina graminifolia*, an invasive orchid species from southeast asia [J]. Biotropica, 46(2): 157-165.

LAMB A, 1994. *Arundina graminifolia*. In: Chan CL, Lamb A, Shim PS, Wood JJ (eds) Orchids of Borneo, Vol 1 [M]. The Sabah Society, Kota Kinabalu, in association with Royal Botanic Gardens, Kew, pp64–66.

LAMB A, 2010. The different varietal forms of *Arundina graminifolia* in Sabah, Borneo [J]. Malesian Orchid J, 5: 7 - 16.

LI L, LIANG HX, PENG H, et al., 2003. Sporogenesis and gametogenesis in *Sladenia* and their systematic implication [J]. Bot Linn Soc, 143(3): 305 - 314.

LI L, ZHANG J, WANG YP, et al., 2019. Pollinia development of in a new species of *Pennilabium yunnanensis* (Orchidaceae) with systematic implications [J]. Bull Bot Res, (accepted). [李璐，张锦，王艳萍等，2019. 兰科新种巾唇兰的花粉团发育及分类学意义

[J].《植物研究》（已接受发表）]

LI M, ZHANG G, LAN S, et al., 2016. A molecular phylogeny of Chinese orchids [J]. J Syst Evol, 54(4): 349 - 362.

LIANG HX, 1981. Sporogenesis and the formation of male and female gametophyte of *Gastrodia elata* [J]. J Integr Plant Biol, (3): 186-191. [梁汉兴，1981. 天麻大小孢子的发生和雌雄配子体的形成[J]. 植物学报，(3)：186 -191.]

LIU MF, Han Y, XING DM, et al., 2005. One new benzyldihydrophenanthrene from *Arundina graminifolia* [J]. J Asia Nat Prod Res, 7(5): 767-770.

NADOT S, FURNESS CA, SANNIER J, et al., 2008. Phylogenetic comparative analysis of microsporogenesis in angiosperms with a focus on monocots [J]. Amer J Bot, 95(11): 1426 - 1436.

OKINAWA P, 2006. Threatened wildlife of Okinawa Prefecture: red data book Okinawa, revised edn, (fungi and vascular plants) [M]. Nat Conservation Division, Naha.

PRIDGEON AM, CRIBB PJ, CHASE MW, et al., 2005. Genera Orchidacearum, vol 4, Epidendroideae (part one) [M]. Oxford University Press, New York.

RAO AN, 1967. Flower and seed development in *Arundina graminifolia* [J]. Phytomorphology, 17: 291 - 300.

SEIDENFADEN G, WOOD JJ, 1992. The orchids of peninsular Malaysia and Singapore [M]. The orchids of Peninsular Malaysia and Singapore.

SOOD, SK, 1985. Gametophytes, integuments initiation and embryogeny in *Microstylis cylindrostachya* (Orchidaceae, Epidendreae) [J]. Proc Indian Acad Sci (Plant Sci), 95 (6): 379 - 387.

SOOD SK, RAO PRM. 1986. Gametophytes, Embryogeny and Pericarp of *Microstylis wallichii* Lindl. [J]. Bot Mag Tokyo, 99: 351–359.

SOOD SK, 1986. Gametogenesis, integuments initiation and embryogeny in three species of *Habenaria* (Orchidaceae, Orchideae) [J]. Proc Indian Acad Sci (Plant Sci), 96(6); 487 - 494.

SOOD SK. 1988. Development of gametophytes, embryogeny and pericarp in *Goodyera repens* (Orchidaceae, Neottieae) [J]. Proc Indian Acad Sci (Plant Sci), 98(2): 149 - 156.

SOOD SK, RAO PRM, 1988. Studies in the embryology of the diandrous orchid *Cypripedium cordigerum* (Cypripedieae, Orchidaceae) [J]. Plant Sys Evol, 160:159-168.

SOOD SK, 1989. Embryology and systematic position of *Liparis* (Orchidaceae) [J]. Plant Sys Evol, 166: 1 - 9.

SOOD SK, 1992. Embryology of *Malaxis saprophyta*, with comments on the systematic position of *Malaxis* (Orchidaceae) [J]. Plant Syst Evol, 179: 95 - 105.

SRIYOTN, THANMMATHAWORN A, THEERAKULPISUT P, et al., 2015. Embryology of *Spathoglottis plicata* Blume : reinvestigation and additional data [J]. Trop Nat Hist, 15(2): 97 - 115.

SUGIURA N, 2014. Pollination and floral ecology of *Arundina graminifolia* (Orchidaceae) at the northern border of the species' natural distribution [J]. J Plant Res, 127(1): 131-139.

SWAMY BG, 1949. Embryological Studies in the Orchidaceae I. Ggameophytes [J]. Am Midl Nat, 41(1): 202 - 232.

XU ZY, YANG MX, 1986. Cytomorphological studies on the microsporogenesis and the formation of male gametophytes in *Dendrobium candium* Wall. ex Lindle [J]. J Yunnan Univ (Nat Sci Ed), 8(3): 310 - 318. [徐正尧，杨貌仙，1986. 黑节草小孢子发生及雄配子体形成的细胞形态学研究[J]. 云南大学学报(自然科学版)，8(03)：310 - 318.]

YORIFUJI E, ISHIKAWA N, OKADA H, et al., 2015. *Arundina graminifolia* var. *revoluta* (Arethuseae, Orchidaceae) has fern-type rheophyte characteristics in the leaves [J]. J Plant Res, 128 (2):1 - 9.

ZHANG WZ, LIN BY, LIN DQ, et al., 2011. Aseptic Sowing and Rapid Propagation Technology for *Arundina graminifolia* (D. Don) Hochr [J]. Chin J Trop Agric, 31(12): 16-19. [张文珠，林炳英，林德钦等，2011. 竹叶兰的无菌播种快繁技术研究[J]. 热带农业科学，31(12): 16 - 19.]

ZHANG J, ZHANG H, LI L, et al., 2019. Pollinia development in rare orchid of *Vanda coerulea* with its taxonomic implications [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 39 (7): 1143-1153. [张锦, 张辉, 李璐等，2019. 珍稀濒危植物大花万代兰的花粉团发育及其分类学意义 [J]. 西北植物学报，39 (7): 1143-1153]